

多基因修饰小鼠诱导多潜能干细胞分化为胰岛素分泌细胞

范向军^{1,2}, 王雷², 陆玉华², 朱铭岩², 钱海鑫^{1*}, 王志伟^{2*}

1. 苏州大学附属第一医院普通外科, 苏州 215006

2. 南通大学附属医院普通外科, 南通 226001

[摘要] **目的** 观测胰岛素转录关键调控因子胰腺十二指肠同源框蛋白 1(PDX-1)、神经分化因子 1(NeuroD1)及肌腱膜纤维肉瘤癌基因同系物 A(MafA)对小鼠诱导多潜能干细胞(iPS 细胞)分化为胰岛素分泌细胞的作用。**方法** 筛选鉴定小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)重编程的 iPS 细胞。以重组腺病毒 Ad-*mPDX-1*-IRES-GFP、Ad-*mNeuroD1*-IRES-GFP、Ad-*mMafA*-IRES-GFP 联合感染小鼠 iPS 细胞,体外培养后以 RT-PCR 检测胰岛 B 细胞功能基因表达;免疫荧光检测胰岛素蛋白表达及定位;ELISA 检测不同糖浓度(0、5、10、20、30、40 mmol/L)下胰岛素的分泌量。**结果** 起源于 MEFs 的 iPS 细胞能形成边缘光整的致密克隆,表达干性基因 *Nanog*、*ReX-1*、*SSEA-1*,并能在体内外分化为三胚层组织,显示 MEFs 被成功地重编程为 iPS 细胞。Ad-PDX-1-IRES-GFP、Ad-mNeuroD-IRES-GFP、Ad-mMafA-IRES-GFP 感染的小鼠 iPS 细胞能分化为胰岛类 B 细胞,RT-PCR 结果显示其胰岛 B 细胞功能基因的表达与小鼠胰岛 B 细胞株 MIN6 相似。免疫荧光检测可见胰岛类 B 细胞内有胰岛素表达。ELISA 检测结果显示胰岛类 B 细胞对不同浓度葡萄糖有较好的反应性。**结论** 胰岛素转录关键调控因子 PDX-1、NeuroD1 和 MafA 三者能协同作用,使小鼠 iPS 细胞分化为具有显著胰岛素合成和分泌能力的胰岛素分泌细胞。

[关键词] 诱导多潜能干细胞;胰岛素分泌细胞;转录因子;细胞分化

[中图分类号] R 329.29 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)07-0700-08

Polygene-modified mouse induced differentiation of pluripotent stem cells into insulin-producing cells

FAN Xiang-jun^{1,2}, WANG Lei², LU Yu-hua², ZHU Ming-yan², QIAN Hai-xin^{1*}, WANG Zhi-wei^{2*}

1. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China

2. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the effects of key insulin gene transcription regulators (PDX-1, NeuroD1 and MafA) on the differentiation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) into insulin-producing cells. **Methods** Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were infected with lentivirus (LV-ef1a-Hygromycin-TRE-*Oct4/Sox2/Klf4/cMyc*) at a multiplicity of infection, and iPSCs were selected and identified. Then the iPSCs were infected with adenovirus (Ad-*mPDX-1*-IRES-GFP, Ad-*mNeuroD1*-IRES-GFP and Ad-*mMafA*-IRES-GFP) to induce differentiation into insulin-producing cells *in vitro*. RT-PCR was applied to detect expression of functional genes in pancreatic islet B cells; immunofluorescence was used to examine the expression and location of insulin protein; and ELISA was used to determine the volumes of secreted insulin at different concentrations of glucose (0, 5, 10, 20, 30, and 40 mmol/L). **Results** The iPSCs derived from MEFs could form intensive clones with smooth boundary, express embryonic stem cell-specific cell surface markers, including *Nanog*, *SSEA-1* and *ReX-1*, and differentiate into three embryonic layers, which indicating that MEFs were successfully reprogrammed into iPSCs. Mouse iPSCs infected with Ad-*PDX-1*-IRES-GFP, Ad-*mNeuroD*-IRES-GFP, and Ad-*mMafA*-IRES-GFP could differentiate into pancreatic islet B cells. RT-PCR results showed that polygene-modified iPSCs and pancreatic islet B-cell line MIN6 had similar gene expression profile. Immunofluorescence analyses confirmed insulin expression in the differentiated cells. Results of ELISA showed that polygene-modified iPSCs had a satisfactory response to different concentrations of glucose. **Conclusion** Key insulin gene transcription regulators PDX-1, NeuroD1 and MafA can work synergistically to induce mouse iPSCs differentiation into

[收稿日期] 2013-01-20 **[接受日期]** 2013-05-02

[基金项目] 国家自然科学基金(81101615, 81070656),中国博士后基金(2012M521107),江苏省自然科学基金(BK2010276). Supported by National Natural Science Foundation of China (81101615, 81070656), Postdoctoral Science Foundation of China (2012M521107), and Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2010276).

[作者简介] 范向军, 博士生, 副主任医师. E-mail: fxj1266@tom.com

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 0512-65223637, E-mail: qianhaixin1@hotmail.com; Tel: 0513-81161108, E-mail: wzw3639@sina.com

pancreatic islet B cells capable of insulin biosynthesis and secretion.

[Key words] induced pluripotent stem cells; insulin-secreting cells; transcription factors; cell differentiation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(7): 700-707]

细胞移植治疗 1 型糖尿病是近年来研究的热点。虽然胰腺或胰岛移植能有效降低血糖水平和改善糖尿病症状^[1],但是供体缺乏和免疫排斥等问题迫使人们去寻找功能、数量都与正常 B 细胞相匹配的替代细胞。目前用于获取 B 细胞的种子细胞主要有 3 种:(1)成体干细胞,如骨髓间充质干细胞^[2-4]。(2)胰腺发育过程中与胰腺分化相近的终末组织细胞,如肝细胞^[5]、肠道内分泌细胞^[6]、肌细胞^[7]、胰腺外分泌细胞等^[8-9]。(3)全能干细胞,如胚胎干细胞(ESC)^[10-12]或诱导多潜能干细胞(iPS 细胞)^[13-14]。在胰腺 B 细胞发育分化过程中,胰腺十二指肠同源框蛋白 1(PDX-1)是胰腺发育形成的开关基因,表达于胰腺前体细胞,对于胰腺发育、B 细胞分化和成熟具有重要意义^[15-16]。神经分化因子 1(NeuroD1)对胰腺内分泌细胞的分化具有重要作用,同样调节胰岛素基因转录^[17-18]。而肌腱膜纤维肉瘤癌基因同系物 A(MafA)仅表达于 B 细胞分化终末期,激活胰岛素基因的转录,MafA 表达受限将影响胰岛素的合成分泌^[19]。胰腺 B 细胞发育分化的不同阶段均受多种转录因子的网络化调节。PDX-1、NeuroD1 和 MafA 单独作用对胰岛素转录影响并不十分明显,而三者协同作用则能促进胰岛素的生成^[8,20]。ESC 能在体内外分化为内、中、外三胚层组织,但其自然分化的组织中内胚层含量极低^[21-22]。iPS 细胞具有全能干性又避免了胚胎毁损等伦理学问题,所以本研究选用起源于 C57BL/6J 小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)的 iPS 细胞作为种子细胞,通过体外感染 Ad-mPDX-1-IRES-GFP、Ad-mNeuroD1-IRES-GFP 及 Ad-mMafA-IRES-GFP,使其向胰岛 B 细胞定向分化,模拟胰岛 B 细胞发育分化的相关条件,为获得具有完整生理功能的 B 细胞用于临床治疗做进一步探索。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及材料

含小鼠目的基因 PDX-1、NeuroD1、MafA 的腺病毒载体(本课题组在前期研究^[23]中已完成构建及包装并保存有病毒液);LV-ef1a-Hygromycin-TRE-Oct4/Sox2/Klf4/cMyc 和表达 rtTA 的慢病毒载体(构建及包装委托上海斯

丹赛生物技术有限公司完成);polybrene(Sigma);0.25%胰蛋白酶(Sigma);DMEM 低糖培养液(Hyclone);胎牛血清(Gibco);谷氨酰胺(Sigma);PBS(Hyclone);knockout DMEM(Gibco); β -巯基乙醇(Sigma);非必需氨基酸(Sigma);白细胞抑制因子(LIF,Prospec);丝裂霉素 C(Sigma);明胶(Sigma);碱性磷酸酶染色试剂盒(上海斯丹赛生物技术有限公司);兔抗小鼠 Nanog IgG 抗体(Santa Cruz, SC-33760);羊抗小鼠 Rex-1 IgG 抗体(Santa Cruz, SC-50668);小鼠抗小鼠 SSEA-1 IgM 抗体(Abcam, ab16285);异硫氰酸荧光素(FITC)驴抗羊荧光抗体(Proteintech);Texas Red 羊抗兔荧光抗体(Proteintech);Cy3 羊抗小鼠荧光抗体(Proteintech);葡萄糖(Sigma);微量 RNA 提取试剂盒(Omega);反转录试剂盒(Fermentas);PCR 试剂盒(Fermentas);琼脂糖(TaKaRa);兔抗小鼠胰岛素多克隆抗体(Santa Cruz);Cy3 羊抗兔荧光抗体(Proteintech);小鼠超敏胰岛素 ELISA 试剂盒(Mercodia);Hoechst 33342(Sigma);抗荧光淬灭封片液(碧云天生物技术研究)。SPF 级健康 C57BL/6J 小鼠购自南通大学实验动物中心[许可证号:FYXK(苏)2007-0021]。

1.2 MEFs 重编程 iPS 细胞的筛选鉴定

1.2.1 MEFs 的分离培养

取孕 12.5~13.5 d 的 C57BL/6J 胎鼠,去除胎鼠头部、内脏、四肢及尾,用显微剪将躯干剪成 $<1\text{ mm}^3$ 的碎块,0.05%胰蛋白酶消化 5 min 后吸除上清,于 MEF 培养液(DMEM 低糖培养液+10%胎牛血清+4 mmol/L 谷氨酰胺)中,反复消化多次直至组织块消失。离心后重悬细胞于 MEF 培养液中,待细胞长至 80%~90%融合时传代或冻存。

1.2.2 饲养细胞的制备

第 3~5 代 MEFs 的培养上清中加入丝裂霉素 C,使丝裂霉素 C 的终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$,放回培养箱中作用 2.5 h。PBS 洗涤丝裂霉素 C 处理过的 MEFs。消化后种植到预先用 0.1%明胶包被过的培养瓶内(种植的细胞数为 6×10^4 个/ cm^2),备小鼠 iPS 细胞的培养。

1.2.3 MEFs 受染重编程为小鼠 iPS 细胞

LV-ef1a-Hygromycin-TRE-Oct4/Sox2/Klf4/cMyc 及 rtTA 慢病毒加入 1×10^5 个第 3 代 MEFs 中,加入 10 $\mu\text{g/mL}$ 助剂 polybrene 接种于 6 孔板中,10 h 后去病毒。

24 h 将慢病毒感染后的细胞消化下来,按每孔 1×10^4 个细胞接种至饲养层细胞上。第 2 天,将 MEF 培养液换成小鼠 ESC 培养液(knockout DMEM+15% 胎牛血清+1×非必需氨基酸+1×谷氨酰胺+0.1 mmol/L β-巯基乙醇+LIF 1 000 U/mL)继续培养,以后每 2 d 换液 1 次。细胞长至第 11~13 天,挑取克隆,将小鼠 ESC 样的克隆挑至新的饲养层细胞上,继续培养、扩增。

1.2.4 碱性磷酸酶染色 吸除细胞培养液,用 PBS 润洗 2~3 次,用多聚甲醛溶液固定 1~2 min。碱性磷酸酶染色试剂覆盖孔底,室温避光放置 15 min。吸出染色液,用 PBS 缓冲液润洗后镜检。

1.2.5 拟胚体形成 小鼠 iPS 细胞扩增培养后,利用差异贴壁法洗涤去除饲养细胞,吹打成单细胞后悬浮培养在 MEF 培养液中。3 d 后第 1 次换液,之后每 2~3 d 换液 1 次。

1.3 畸胎瘤形成实验 小鼠 iPS 细胞系传代培养至 10 代以上后,利用差异贴壁法洗涤去除饲养细胞后单细胞重悬于 300 μL 小鼠 ESC 培养液中,无菌注射入 NOD-SCID 小鼠的腋下,每个注射点的细胞量约为 $(2\sim3) \times 10^6$ 个。8 周后取出畸胎瘤进行 H-E 染色,观察分化为三胚层情况。

1.4 小鼠 iPS 细胞受染分化为胰岛素分泌细胞 小鼠 iPS 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后与所需的 Ad-*mPDX-1*-IRES-GFP、Ad-*mNeuroD1*-IRES-GFP 及 Ad-*mMafA*-IRES-GFP 加入含 10 μg/mL 表皮生长因子(EGF)的 MEF 培养液中,重悬于超低吸附 6 孔板中(2 mL/孔),病毒维持在 MEF 培养液中 2 d,第 4 天重复感染胚体 1 次(24 h)。6 d 后收集胚体,用 MEF 培养液重悬于普通 6 孔板中。待大量细胞自胚体爬出时消化传代。

1.5 RT-PCR 检测相关基因表达 小鼠 iPS 细胞内源性干性基因(*Nanog*、*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*cMyc*)的引物序列见表 1;小鼠 iPS 细胞受染分化后外源性转录因子及胰岛 B 细胞功能基因[*PDX-1*、*NeuroD1*、*MafA*、胰岛素 1(*insulin1*)、*insulin2*、葡萄糖激酶(*glucokinase*)、葡萄糖转录因子 2(*Glut2*)、胰高血糖素(*glucagon*)、*Kir6.2*、*SUR-1*、*PC2*、*PC1/3*]的引物序列见表 2。

1.5.1 细胞总 RNA 的提取 细胞去掉培养液后用 DEPC 水洗 1 次,加 1 mL TRIzol 裂解约 5 min。5 min 后加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡 15 s,静置约 2~3 min。4℃ 12 000×g 离心 15 min。将上层水相转

移到新管中,用异丙醇沉淀水相中的 RNA。每使用 1 mL TRIzol 加入 0.5 mL 异丙醇,静置 10 min。4℃ 12 000×g 离心 10 min,离心后在管侧和管底出现胶状沉淀,移去上清。用 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀。加 1 mL 75%乙醇,4℃ 7 500×g 离心 5 min,弃上清。室温放置干燥 RNA 沉淀后加入 50~100 μL 无 RNase 的水,用枪头吸打几次溶解 RNA,紫外分光光度计测 RNA 浓度。

表 1 小鼠诱导多潜能干细胞内源性干性基因的引物序列

Tab 1 Primers of endogenous *Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* and *c-Myc* in iPSCs

Gene	Primer (5'-3')
<i>Nanog</i>	
Forward	TGC TTA CAA GGG TCT GCT ACT G
Reverse	AGC CTC AGG ACT TGA GAG CTT
<i>Oct4</i> (endogenous)	
Forward	CAA GGC AAG GGA GGT AGA CA
Reverse	CAA AAT GAT GAG TGA CAG ACA GG
<i>Sox2</i> (endogenous)	
Forward	GAA CTG GAG AAG GGG AGA GAT T
Reverse	ATT TGG ATG GGA TTG GTG GT
<i>Klf4</i> (endogenous)	
Forward	TGC TTG GTG AGT CGT GGT TC
Reverse	AGG CTT ATT TAC CTG GCT TAG G
<i>cMyc</i> (endogenous)	
Forward	ACA CGG AGG AAA ACG ACA AG
Reverse	TCG TCG TTT CCT CAA TAA GTC C
GAPDH	
Forward	CAG GTT GTC TCC TGC GAC TT
Reverse	GGT GGT CCA GGG TTT CTT ACT

iPSC: Induced pluripotent stem cell

1.5.2 第一链 cDNA 合成 模板 RNA 0.1 ng~5 μg, oligo (dT) 18 primer 1 μL, 再加 nuclease-free water 至 12 μL。将 1 μL RiboLock™ RNase Inhibitor、2 μL 10 mmol/L dNTP Mix、1 μL RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/μL) 加入无菌的无核酸酶的离心管中,混匀并离心,42℃ 孵育 60 min。70℃ 孵育 5 min 终止反应。

1.5.3 PCR 扩增 94℃ 预变性 5 min,后经过 35 个循环的 94℃ 变性 30 s、55~60℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 30 s,最后 72℃ 总延伸 10 min。

1.5.4 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳鉴定 行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,凝胶成像系统检测电泳结果。

1.6 细胞免疫荧光染色 细胞固定在 4% 多聚甲醛

中,室温放置 30 min。在无水乙醇中浸泡 3 次,每次 10 min(限于核蛋白)。吸干上述溶液,用 1×PBS 洗涤 1 次后再用抗体稀释液(0.2% BSA 和 0.1% Triton X-100 溶于 PBS)洗涤 2 次。用封闭液(含 6% BSA+0.3% Triton X-100 的 PBS 溶液)封闭细胞。将一抗稀释在抗体稀释液中,加到样品上,4℃ 放置过夜。用 PBT(0.1% Triton X-100)洗涤细胞 3~5 次。将二抗稀释在抗体稀释液中,并加到细胞样品上,室温放置 1 h。用 PBT 洗涤 3 次。将 Hoechst(1 mg/mL)母液以 1:1 000 用 PBS 稀释,室温放置 30 min。用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。

表 2 胰岛 B 细胞功能基因的引物序列

Tab 2 Primers of specified genes in pancreatic islet B cells

Gene	Primer (5'-3')
<i>Insulin 1</i>	
Forward	ACT ATA AAG CTG GTG GGC ATC
Reverse	GGG ACT TGG GTG TGT AGA AGA
<i>Insulin 2</i>	
Forward	CAA GCA GCA CCT TTG TGG TT
Reverse	AAG GTC TGA AGG TCA CCT GC
<i>Glucokinase</i>	
Forward	TGG TGG CAA TGG TGA ATG A
Reverse	CCA CCA TCC GGT CGT ACT C
<i>Glut 2</i>	
Forward	GAT CGC TCC AAC CAC ACT CA
Reverse	CCA AGT AGG ATG TGC CAA TGA T
<i>Glucagon</i>	
Forward	GCT GAT GGC TCC TTC TCT GAC
Reverse	ATC GTT GGG TTA CAC AAT GCT A
<i>Kir 6. 2</i>	
Forward	GTA GAA ACC ACG GGC ATC AC
Reverse	AGA CTG CGG TCC TCA TCA AG
<i>SUR-1</i>	
Forward	GCG TCA GCG AAT CAG TGT AG
Reverse	GAG GCA GGT ACT GTA GCT TGT G
<i>PC2</i>	
Forward	GCT GGC GTG TTT GCA TTA G
Reverse	CCG TAG CCA AAG AGG TGA TT
<i>PC1/3</i>	
Forward	GCC TAG AGC CCT GAA AGC TAA
Reverse	GTT CCA ACA GCA GAA GTG AGT G
<i>PDX-1</i>	
Forward	TGG ATG AAA TCC ACC AAA GC
Reverse	TGT GTC TCT CGG TCA AGT TCA A
<i>NeuroD1</i>	
Forward	TCC AGG GTT ATG AGA TCG TCA
Reverse	TCT TGT CTG CCT CGT GTT CC
<i>Ma fA</i>	
Forward	TTC AGC AAG GAG GAG GTC AT
Reverse	CTT CTC GCT CTC CAG AAT GTG
<i>CAR</i>	
Forward	TCC TGC TGA CCG TTC TTG TTA
Reverse	CGC AGC ATA CAC TGG TCA GA

1.7 ELISA 法检测胰岛素分泌量 取受染 18 d 培养分化的细胞,吸去培养液,加入克-林缓冲液预培养 1 h。用含不同浓度葡萄糖(0、5、10、20、30、40 mmol/L)的克-林缓冲液继续培养 1 h,收集缓冲液-80℃ 保存。取出试剂盒及标本,平衡至室温。以酶结合物稀释液稀释酶结合物(1:10),以双蒸水稀释洗涤液(1:20),临用前 15 min 配好。取出板条,吸出 10 μL 标准品和标本加入相应的孔中。每孔加入 100 μL 酶结合物稀释液。封板胶纸封住反应孔,室温下在摇床上培养 2 h。每孔加入 350 μL 洗涤液,洗板 6 次。每孔加入 200 μL 显色液,室温避光孵育 15 min。每孔加入 50 μL 终止液,充分混匀。多功能酶标仪测 450 nm 处光密度,计算胰岛素含量。

2 结果

2.1 MEFs 的获取 传代到第 3 代时,MEFs 细胞形态趋于均匀一致,杂细胞极少(图 1A)。

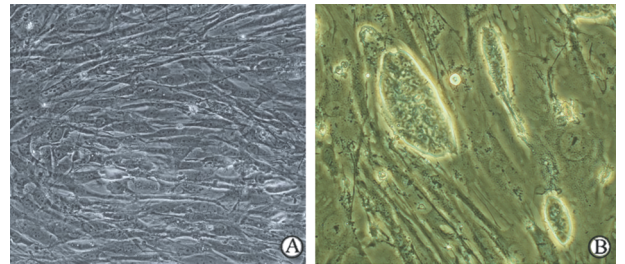


图 1 小鼠胚胎成纤维细胞(A)及第 16 代小鼠诱导多潜能干细胞克隆(B)显微镜下形态

Fig 1 Phase contrast images of MEFs (A) and iPSCs clones established from MEFs (B)

MEF: Mouse embryonic fibroblast; iPSC: Induced pluripotent stem cell. Original magnification: ×200

2.2 小鼠 iPS 细胞的诱导 LV-ef1a-Hygromycin-TRE-Oct4/Sox2/Klf4/cMyc 及表达 rtTA 的慢病毒感染 MEFs 的感染复数(MOI)均为 20:1。重编程过程如下:感染 12 h 后去除病毒,24 h 后接种于饲养细胞上。重编程 11~13 d 时挑取克隆,整个重编程过程的干细胞培养液加入 6 μg/mL 的多西环素。纯化的小鼠 iPS 细胞克隆(图 1B)和周围存在明显界限,克隆中的细胞胞核大,胞质少,细胞排列紧密,彼此间界限不清。

2.3 小鼠 iPS 细胞的鉴定 重编程 MEFs 获取的小鼠 iPS 细胞克隆碱性磷酸酶染色阳性(图 2A),表达干细胞表面标记 Nanog、Rex-1 及 SSEA-1(图

2B)。以 MEFs 作为阴性对照,小鼠 ESC 作为阳性对照,RT-PCR 检测小鼠 iPS 细胞干细胞内源性基因 *Nanog*、*Oct4*、*Sox2*、*Klf4* 及 *cMyc* 的表达(图 2C),可以清晰看到小鼠 iPS 细胞干细胞内源性基因的表达与阳性对照小鼠 ESC 相似,而 MEFs 的干细

胞内源性基因的表达极低或缺失。小鼠 iPS 细胞单细胞悬浮培养于 MEF 培养液中能形成拟胚体(图 2D)。小鼠 iPS 细胞传代培养至 10 代以上无菌注射至 NOD-SCID 小鼠的腋下,8 周后能成瘤,H-E 染色显示瘤组织为畸胎瘤(图 2E)。

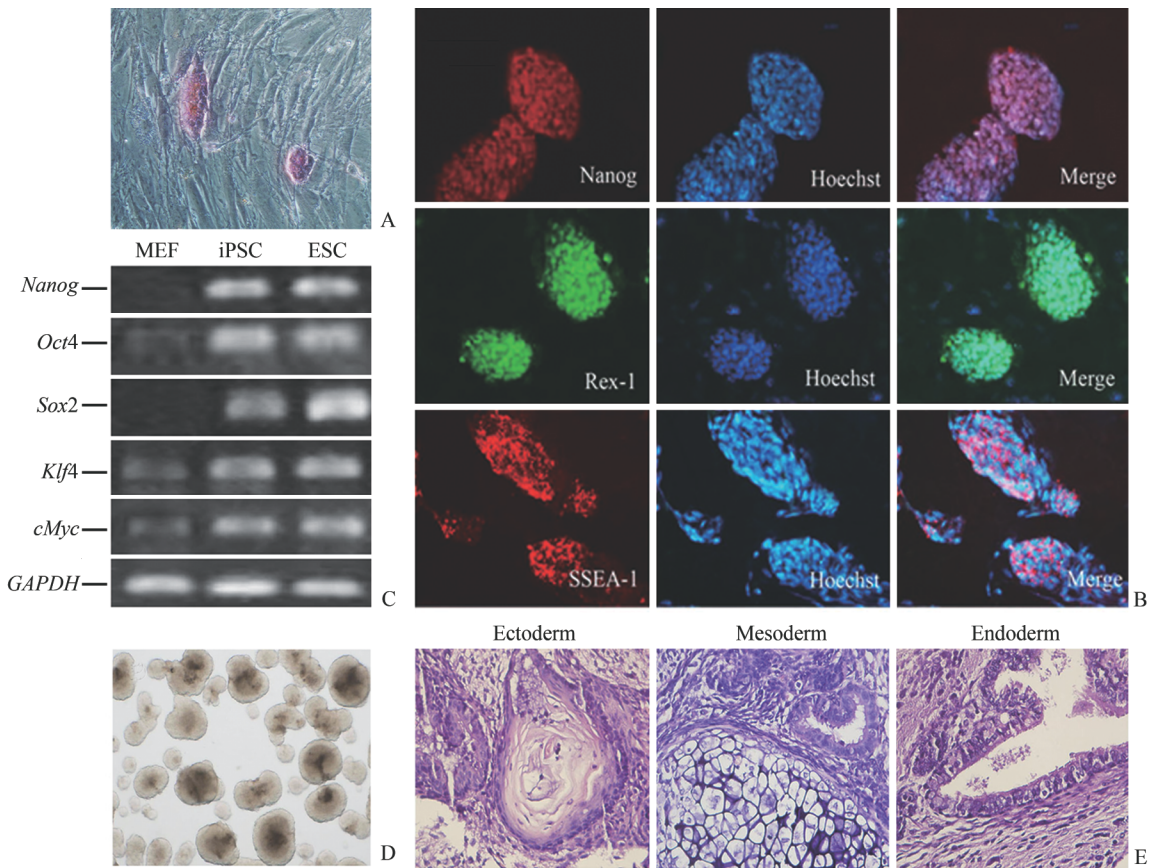


图 2 小鼠诱导多潜能干细胞的鉴定结果

Fig 2 Verification of the pluripotency of iPSCs established from MEFs

A: Alkaline phosphatase (AP) staining of iPSCs clones established from MEFs; B: Immunofluorescence showing the expression of pluripotency markers in expanded iPSCs clones; C: RT-PCR analysis of endogenous *Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* and *c-Myc* in iPSCs compared with the gene expression observed in the parental somatic cell populations and ES cells; D: Phase-contrast images showing EBs differentiated from iPSCs; E: H-E and eosin staining of teratomas derived from immunodeficient mice that were subcutaneously injected with iPSCs, representing all three embryonic germ layers, including neural tissue (ectoderm), cartilage (mesoderm), and epithelium (endoderm). iPSC: Induced pluripotent stem cell; MEF: Mouse embryonic fibroblast; ESC: Embryonic stem cell; EB: Embryoid body. Original magnification: $\times 200$ (A,E), $\times 400$ (B); $\times 60$ (D)

2.4 胰岛素分泌细胞的获取及鉴定

2.4.1 转染小鼠 iPS 细胞荧光染色

本研究检测了小鼠 iPS 细胞及其形成的拟胚体柯萨奇病毒腺病毒受体(CAR)的表达情况,RT-PCR 显示小鼠 iPS 细胞及其形成的拟胚体均表达 CAR。Ad-*mPDX-1*-IRES-GFP、Ad-*mNeuroD1*-IRES-GFP 及 Ad-*mMafA*-IRES-GFP 感染小鼠 iPS 细胞的 MOI 均为 250 : 1。受染的小鼠 iPS 细胞在超低吸附板中向拟胚体分化 6 d,同一视野下拟胚体表达绿色荧光(图

3A、3B),表明转入的目的基因 *PDX-1*、*NeuroD1* 及 *MafA* 已开始表达。将拟胚体转移至 6 cm 细胞培养皿中,2 d 后可以观察到拟胚体已贴壁,边缘有少量细胞爬出。6 d 后拟胚体边缘有大量细胞爬出,并表达绿色荧光(图 3C、3D)。

2.4.2 胰岛 B 细胞功能基因的检测

以空病毒载体转染的小鼠 iPS 细胞分化的拟胚体作为阴性对照,小鼠 iPS 细胞作为空白对照,以小鼠胰岛 B 细胞系 MIN6 作为阳性对照,通过 RT-PCR 检测各组外

源性转录因子及胰岛 B 细胞功能基因的表达(图 4), 可以看到三基因联合修饰的小鼠 iPS 细胞的胰

岛 B 细胞功能基因的表达与小鼠胰岛 B 细胞系 MIN6 相似, 明显优于阴性对照组及空白对照组。

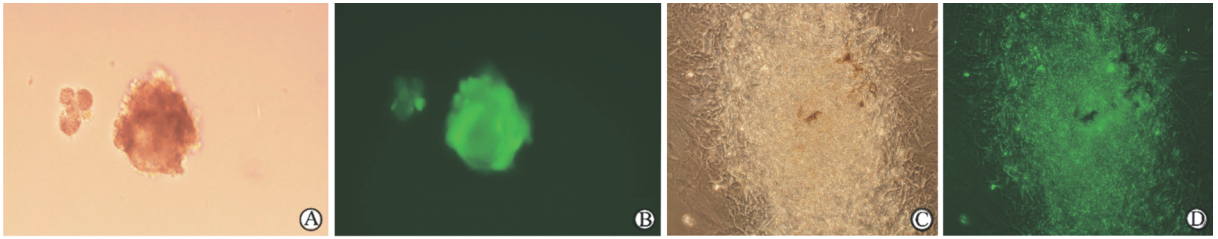


图 3 三基因转染的小鼠诱导多潜能干细胞在荧光显微镜下同一视野的明视野及荧光图

Fig 3 Directed differentiation of iPSCs into insulin-producing cells *in vitro* of the same visual field

A: Bright-field images of 6-day EBs derived from *PDX-1*-, *NeuroD1*- and *MafA*-infected iPSCs; B: GFP-expression was observed in 6-day EBs using fluorescent microscopy; C: Bright-field images of 6-day EBs that had been transferred to cell culture dishes for another 6 days; D: GFP-expression of figure 3C. iPSC: Induced pluripotent stem cell; EB: Embryoid body. Original magnification: $\times 40$ (A,B); $\times 100$ (C,D)

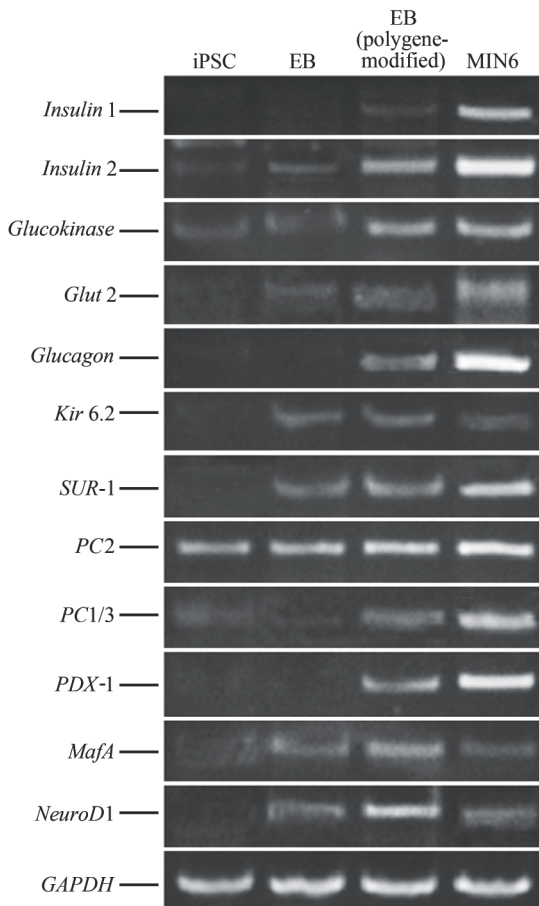


图 4 定向诱导分化的小鼠诱导多潜能干细胞外源性转录因子及胰岛 B 细胞功能基因 RT-PCR 检测结果

Fig 4 RT-PCR analysis of *PDX-1*, *NeuroD1*, *MafA* and specified genes in pancreatic islet B cells of insulin-producing cells

iPSC: Induced pluripotent stem cell; EB: Embryoid body

2.4.3 免疫荧光检测胰岛素表达 定向诱导分化的小鼠 iPS 细胞体外培养 18 d 后, 免疫荧光观察到

细胞胞质内表达稳定的红色荧光(图 5), 而同一批次未受染的细胞胞质中无明显阳性反应, 表明导入三基因后定向诱导分化的小鼠 iPS 细胞内有胰岛素蛋白的表达。

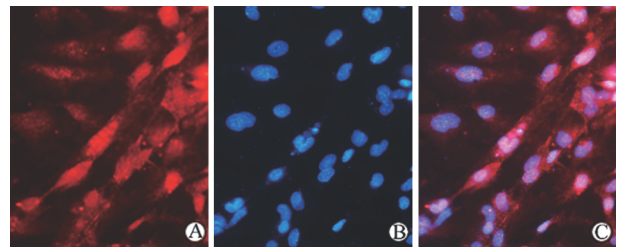


图 5 细胞爬片免疫荧光结果

Fig 5 Expression of the insulin protein in the infected cells by immunofluorescence examination

A: Cells were incubated with anti-mouse insulin antibody; B: Nuclei were stained blue with Hoechst dye; C: Merge of A and B. Original magnification: $\times 400$

2.4.4 体外胰岛素分泌的检测 如图 6 所示, 定向诱导分化的小鼠 iPS 细胞对葡萄糖的反应是剂量依赖性的, 当葡萄糖浓度较低时(5 mmol/L 及 10 mmol/L)细胞胰岛素的分泌量较低, 葡萄糖浓度为 30 mmol/L 时胰岛素的释放量达最高, 当葡萄糖浓度为 40 mmol/L 时胰岛素的释放量有所下降, 与 30 mmol/L 葡萄糖浓度组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

胰岛 B 细胞在体内的分化发育大体分为 4 步: 内胚层分化、胰腺分化、内分泌细胞分化和 B 细胞成熟。胰岛 B 细胞发育过程极其复杂, 其表型功能维

持涉及多种信号通路(如 Nodal、Notch 信号通路),需要多种转录因子如成纤维细胞生长因子、骨形态发生蛋白、表皮生长因子、肝细胞核因子(HNF)1 β 、HNF4、HNF6、PDX-1、NeuroD1、MafA、Sox9 等调节^[24]。

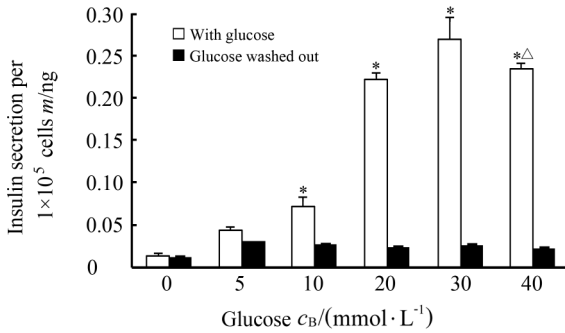


图 6 定向诱导分化的小鼠诱导多潜能干细胞在葡萄糖刺激下的胰岛素分泌量

Fig 6 Insulin secretion by iPSCs induced for directed differentiation after stimulation with glucose

* $P < 0.05$ vs 0 mmol/L glucose group; $\Delta P < 0.05$ vs 30 mmol/L glucose group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

本研究运用 Tet-On 慢病毒系统将 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4* 及 *cMyc* 转入 MEFs,使其重编程为 iPS 细胞,去除培养液中的多西环素后 iPS 细胞仍能形成小鼠 ESC 样克隆。碱性磷酸酶染色、干细胞表面标记检测、干性基因的表达及体内外三胚层分化实验结果显示,重编程获得的小鼠 iPS 细胞内源性的 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4* 及 *cMyc* 已诱导表达且不需要外源性转录因子的作用也能维持自身的全能干性。

本实验发现小鼠 iPS 细胞及其形成的拟胚体均表达 CAR(结果未显示),表明构建的腺病毒载体可有效地感染小鼠 iPS 细胞及其形成的拟胚体。感染小鼠 iPS 细胞分化所得的拟胚体表达绿色荧光,表明转入的目的基因 *PDX-1*、*NeuroD1* 及 *MafA* 已开始转录表达。通过 RT-PCR 发现三基因联合修饰的小鼠 iPS 细胞向拟胚体分化的过程中启动了胰岛素的转录,其胰岛 B 细胞功能基因的表达也与小鼠胰岛 B 细胞系 MIN6 相似,其中对葡萄糖刺激的胰岛素分泌起重要作用的转录因子 *Glut2*、*glucokinase*、*Kir6.2* 及 *SUR-1* 有较高表达。但 *insulin1*、*insulin2* 及 *glucagon* 的表达仍低于小鼠胰岛 B 细胞系 MIN6。原因可能有以下两个方面:(1)三基因诱导所得的胰岛类 B 细胞功能确实不如正常发育的胰岛 B 细胞完善。(2) *PDX-1*、*NeuroD1* 及 *MafA* 转导

不均,小鼠 iPS 细胞向胚体分化过程中细胞内混有胰岛其他类型的细胞或其他组织细胞。不管怎样,可以发现三基因联合修饰的小鼠 iPS 细胞胰岛 B 细胞功能基因的表达优于转染空腺病毒组。不同葡萄糖浓度刺激实验显示定向诱导分化获得的胰岛素分泌细胞对葡萄糖的反应呈剂量依赖性,当葡萄糖浓度为 30 mmol/L 时胰岛素的释放量最高,如继续提高葡萄糖浓度胰岛素的释放量并不持续升高。

本实验发现 *PDX-1*、*NeuroD1* 及 *MafA* 在 iPS 细胞分化为胰岛素分泌细胞的过程中具有重要作用,能获得具有较完整生理功能的类胰岛 B 细胞,但使用 iPS 细胞作为种子细胞获取胰岛 B 细胞仍存在很多问题:(1)体细胞重编程为 iPS 细胞的过程涉及外源性基因的插入,易致基因突变,必须致力于无病毒及无癌基因(如 *cMyc* 基因)iPS 细胞的获取。(2)胰岛 B 细胞缺乏分选纯化的表面标记,难以提纯。(3)本实验导入 iPS 细胞的 3 个基因 *PDX-1*、*NeuroD1* 和 *MafA* 在胰岛 B 细胞发育及胰岛素基因转录过程中具有极为关键的作用,但完全模拟体内胰腺发育过程是困难的,在胰岛 B 细胞胚胎发育过程中仍有其他很多因子是必需的,是否存在其他因子促进胰岛 B 细胞分化并显著提高细胞的成熟度、所诱导的胰岛素分泌细胞在体内能否长期发挥治疗作用并成为合格的替代细胞仍然有待进一步研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Corrêa-Giannella M L, Raposo do Amaral A S. Pancreatic islet transplantation [J]. Diabetol Metab Syndr, 2009, 1:9.

[2] Lu Y, Wang Z, Zhu M. Human bone marrow mesenchymal stem cells transfected with human insulin genes can secrete insulin stably [J]. Ann Clin Lab Sci, 2006, 36: 127-136.

[3] Xie Q P, Huang H, Xu B, Dong X, Gao S L, Zhang B, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into insulin-producing cells upon microenvironmental manipulation *in vitro* [J]. Differentiation, 2009, 77:483-491.

[4] Neshati Z, Matin M M, Bahrami A R, Moghimi A. Differentiation of mesenchymal stem cells to insulin-producing cells and their impact on type 1 diabetic rats [J]. J

- Physiol Biochem,2010,66:181-187.
- [5] He C X, Shi D, Wu W J, Ding Y F, Feng D M, Lu B, et al. Insulin expression in livers of diabetic mice mediated by hydrodynamics-based administration [J]. World J Gastroenterol,2004,10:567-572.
- [6] Lu Y C, Sternini C, Rozengurt E, Zhukova E. Release of transgenic human insulin from gastric g cells; a novel approach for the amelioration of diabetes[J]. Endocrinology,2005,146:2610-2619.
- [7] Mas A, Montané J, Anguela X M, Muñoz S, Douar A M, Riu E, et al. Reversal of type 1 diabetes by engineering a glucose sensor in skeletal muscle[J]. Diabetes, 2006,55:1546-1553.
- [8] Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton D A. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells[J]. Nature,2008,455:627-632.
- [9] Baeyens L, De Breuck S, Lardon J, Mfopou J K, Rooman I, Bouwens L, et al. *In vitro* generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells[J]. Diabetologia,2005,48:49-57.
- [10] Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters[J]. Stem Cells,2004,22:265-274.
- [11] Sulzbacher S, Schroeder I S, Truong T T, Wobus A M. Activin A-induced differentiation of embryonic stem cells into endoderm and pancreatic progenitors-the influence of differentiation factors and culture conditions [J]. Stem Cell Rev,2009,5:159-173.
- [12] Shi Y, Hou L, Tang F, Jiang W, Wang P, Ding M, et al. Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid[J]. Stem Cells, 2005,23:656-662.
- [13] Alipio Z, Liao W, Roemer E J, Waner M, Fink L M, Ward D C, et al. Reversal of hyperglycemia in diabetic mouse models using induced-pluripotent stem (iPS)-derived pancreatic beta-like cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2010,107:13426-13431.
- [14] Saito H, Takeuchi M, Chida K, Miyajima A. Generation of glucose-responsive functional islets with a three-dimensional structure from mouse fetal pancreatic cells and iPS cells *in vitro* [J]. PLoS One,2011,6:e28209.
- [15] Gannon M, Ables E T, Crawford L, Lowe D, Offield M F, Magnuson M A. Pdx-1 function is specifically required in embryonic beta cells to generate appropriate numbers of endocrine cell types and maintain glucose homeostasis[J]. Dev Biol,2008,314:406-417.
- [16] Wang H W, Breslin M B, Lan M S. Pdx-1 modulates histone H4 acetylation and insulin gene expression in terminally differentiated alpha-TC-1 cells[J]. Pancreas, 2007,34:248-253.
- [17] Shimoda M, Chen S, Noguchi H, Matsumoto S, Grayburn P A. Neurogenic differentiation 1 directs differentiation of cytokeratin 19-positive human pancreatic nonendocrine cells into insulin-producing cells [J]. Transplant Proc,2010,42:2071-2084.
- [18] Chu K, Nemoz-Gaillard E, Tsai M J. BETA2 and pancreatic islet development[J]. Recent Prog Horm Res, 2001,56:23-46.
- [19] Matsuoka T A, Kaneto H, Miyatsuka T, Yamamoto T, Yamamoto K, Kato K, et al. Regulation of MafA expression in pancreatic beta-cells in db/db mice with diabetes[J]. Diabetes,2010,59:1709-1720.
- [20] Kaneto H, Matsuoka T A, Kawashima S, Yamamoto K, Kato K, Miyatsuka T, et al. Role of MafA in pancreatic beta-cells[J]. Adv Drug Deliv Rev,2009,61:489-496.
- [21] Kahan B W, Jacobson L M, Hullett D A, Ochoada J M, Oberley T D, Lang K M, et al. Pancreatic precursors and differentiated islet cell types from murine embryonic stem cells: an *in vitro* model to study islet differentiation[J]. Diabetes,2003,52:2016-2024.
- [22] 郭青松,朱铭岩,范向军,陆玉华,王雷,王志伟. 多基因修饰骨髓间充质干细胞分化为胰岛素分泌细胞的实验研究[J]. 中华医学杂志,2011,91:2148-2152.
- [23] Guo Q S, Zhu M Y, Wang L, Fan X J, Lu Y H, Wang Z W, et al. Combined transfection of the three transcriptional factors, PDX-1, NeuroD1, and MafA, causes differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into insulin-producing cells[J]. Exp Diabetes Res,2012, 2012:672013.
- [24] Mayhew C N, Wells J M. Converting human pluripotent stem cells into beta-cells: recent advances and future challenges[J]. Curr Opin Organ Transplant,2010,15: 54-60.